

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 28 552.0

**Anmeldetag:** 24. Juni 2003

**Anmelder/Inhaber:** HöFer Bioreact GmbH, 53115 Bonn/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische durch Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen

**IPC:** C 12 P 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Oktober 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Remus



# **Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung definierter Enzym- und Metabolitgemische durch Induktion und gerichtete selektive Festphasen-Kultivierung stabiler, mikrobieller Mischpopulationen**

5

## **Beschreibung der Erfindung**

- 10 Es ist eine Vielzahl technologischer Prozesse bekannt, bei denen Enzyme bisher nur suboptimal oder gar nicht eingesetzt werden, obgleich dies von großem ökonomischem wie ökologischem Nutzen wäre. Dazu gehören zum Beispiel Verfahren, bei denen komplexe, biologische, feste Substrate verändert oder umgesetzt werden, deren Zusammensetzung sehr heterogen ist, die v. a. auch schwer abbaubare Substanzen wie Lignocellulose enthalten und/oder die äußere Grenzschichten (z. B.
- 15 verholzte Zellwände, Kuticula etc.) besitzen, welche Barrieren für Enzyme darstellen und so die Bioverfügbarkeit einschränken. Für eine effektive Behandlung dieser Substrate wären speziell auf diese Substrate hin optimierte Enzymmischungen notwendig. Dies ist bisher noch nicht als gezielte und gerichtete Herstellung durch entsprechende Fermentationen möglich.
- 20 Dieser Nachteil wird nun dadurch behoben, dass ein neues Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzüchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, zur Verfügung gestellt wird, dadurch gekennzeichnet, dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder
- 25 mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein (wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden sind, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden) zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen
- 30 Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in dem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.

Ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist ferner, dass durch die kontinuierliche Verfahrensführung und modulare Bauweise des neuartigen Bioreaktors die zeitliche Abhängigkeit der

Produktion der Enzymgemische zu deren Optimierung im Hinblick auf den Abbau des Zielsubstrates, bzw. der Zielsubstrate simultan oder sequentiell hin genutzt wird.

## 5 Stand der Technik

In den letzten Jahrzehnten sind verstärkt Anstrengungen unternommen worden, Biomasse durch enzymatischen Aufschluss zu behandeln (siehe zum Beispiel DE19845207A1). So existiert heute eine Reihe von Ansätzen, bei denen gereinigte Enzyme oder Enzymmischungen oder aber  
 10 enzymproduzierende mikrobielle Rein- oder Mischkulturen zur Behandlung biologischer Substrate eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die Behandlung von Holzhackschnitzeln im Zuge des Biopulping, die Behandlung von Einjahrespflanzen zur Verbesserung der Eigenschaften als Futtermittel oder von Bagasse zur Herstellung von Bioalkohol. Jedoch verlaufen alle diese Prozesse nach wie vor suboptimal. Der Hauptgrund dafür ist, dass die verwendeten  
 15 Enzymmischungen, Mikroorganismenkulturen oder Mikroorganismen-Mischkulturen nicht in optimaler Weise an die Zielsubstrate angepasst sind (z. B. sind die Organismen und Enzyme nicht optimal an kalte bis sehr kalte Standorte adaptiert und selektiert), was z. B. beim Biopulping zu sehr langen Behandlungszeiten der Hackschnitzel führt mit entsprechend einhergehendem großen Platzbedarf für die Mietenflächen.

20 Viele biotechnologische Prozesse zur Behandlung von komplexen Substraten (meist Pflanzenmaterial aber auch z.B. Tierabfälle aus Tierschlachtereien etc.) benötigen neben den genannten Enzymgemischen (Hydrolasen, Oxidoreduktasen) zum möglichst weitgehenden Abbau oftmals zusätzlich (v. a. Oxidoreduktasen) bestimmte Cofaktoren oder Mediatoren, die teilweise noch unbekannt sind. Das heißt, dass einzelne Enzyme oder auch Zugaben von Gemischen zum Prozess nur  
 25 bedingt Erfolg zeigen, da nur ein Zusammenspiel von vorher auf die Zielsubstrate hin adaptierten und optimierten Enzymgemischen zusammen mit diesen zusätzlichen Faktoren eine optimale Performance zeigen können. Dies ist aber bisher ebenfalls nicht in optimaler Weise möglich.

Aus DE3539875A1 ist z. B. ein Verfahren und eine Vorrichtung zur kontinuierlichen Herstellung  
 30 einer Enzymmischung für die Behandlung von Biomasse in Biogasanlagen bekannt. Bei diesem Verfahren wird jedoch mit einer reinen Kultur von *Aspergillus niger* und ohne Induktion dieser Kultur an die für die spätere Methanisierung verwendeten pflanzlichen Substrate gearbeitet. Deshalb ist nicht zu erwarten, dass die dort gebildete Enzymmischung optimal an den Biomasse verwertenden Prozess angepaßt ist.

Optimal an ein komplexes, biologisches Substrat adaptierte und definierte Enzymgemische und/oder Metabolitgemische sind nur erzeugbar durch Selektionsdruck auf die produzierenden Mikroorganismen-Populationen (Mischkulturen) und durch deren Induktion durch die entsprechenden Zielsubstrate.

5

Nun ist allgemein bekannt, dass die Anwendung eines Selektionsdrucks auf Mischpopulationen von Mikroorganismen durch Einstellen definierter Umweltparameter im Zuge der Kultivierung dieser Organismen in der Regel zu bestimmten Populationsspektren führt. Diese Populationsspektren sind jedoch ungerichtet und zufällig.

10 Ebenso ist bekannt, dass durch die Wahl der Kulturbedingungen bestimmte Arten von Mikroorganismen angereichert oder Kontaminanten unterdrückt werden können.

Bekannt ist auch, dass es während des Verlaufs solcher Kulturen in Abhängigkeit von den gewählten Selektionsbedingungen, aber auch in Abhängigkeit von der Substratbeschaffenheit und der Induktorverfügbarkeit (bei nicht konstitutiv gebildeten Proteinen und Metaboliten) zu zeitlich variierenden

15 Metabolitspektren kommen kann. Jedoch gilt auch hier, dass diese Metabolitspektren ungerichtet und zufällig sind.

Verfahren der genannten Art werden z.B. auf definierten festen Nährböden (Agarplatten → Mutagenesebehandlungen, genetische Transformationen etc.) sowie im Bereich der Submerskulturfunktion eingesetzt (in Form von Chemostaten oder Turbidostaten auch kontinuierlich). In letzterem

20 Falle handelt es sich vor allem um Kultivierungen von Reinkulturen zur Erzielung von spezifischen Stoffwechselleistungen.

Bioreaktoren zur kontinuierlichen Umsetzung fester Substrate sind aus verschiedenen Anwendungsbereichen (Lebensmitteltechnik, Kompostiertechnik usw.) bekannt. Beispielsweise wird das Fermentationsgut in Kompostieranlagen über Walzen befördert. Solche Verfahren erlauben aber keine anspruchsvolle Regulation der Kultivierungsparameter. Die Verwendung von einer oder mehreren Förderschnecken in Festphasen-Bioreaktoren ist zum Beispiel aus DE10041977A1, DE4308920A1 und DE 4208920A1 bekannt. Diese Bioreaktoren sind jedoch nicht modular ausgelegt und sehen ebenfalls keine Möglichkeit der späteren Zugabe von Substraten und

30 anderen Stoffen zur z. B. Induktion vor.

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Diese beschriebenen Nachteile des Stands der Technik werden durch das im folgenden beschriebene erfindungsgemäße Verfahren sowie den erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen  
5 Durchführung dieses Verfahrens behoben.

Es wird ein neues Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, zur Verfügung gestellt. Dieses ist dadurch gekennzeichnet, dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise  
10 hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein allein (wobei unter Zielsubstrat(en) solche verstanden sind, die in einem nachfolgenden Prozess eingesetzt werden) zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert,  
15 Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.  
20 Dabei sind spezielle Hemmstoffe solche, wie sie z.B. in: R.Vogel; Natürliche Enzyminhibitoren, Georg Thieme Verlag, 1984 und in: H. Zollner; Handbook of Enzyme Inhibitors, VCH, 1989 beschrieben sind.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist, dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche eingesetzt werden, oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung des flüssigen Enzymcocktail erfolgt. Desweiteren ist es möglich, die in solcher Weise gewonnen flüssigen Enzymmischungen einem weiteren Downstream-Prozessen zu unterziehen (Aufreinigung durch Ultrafiltrationen, Chromatographieverfahren etc.).

Ebenfalls ist ein wichtiger Bestandteil der Erfindung, dass die natürliche Kontaminations-  
30 Population von bestimmten Zielsubstraten/Substraten ausgenutzt wird, um daraus gewünschte Keime mit gewünschten Eigenschaften zu selektionieren; noch fehlende Eigenschaften können durch Zugabe geeigneter Induktoren inklusive der auf diesen vorhandenen oder selektionierten Keime supplementiert werden. Diese Zugabe kann zu Beginn der Kultivierung oder während der Anzucht geschehen. Es können auch Reinkulturen, die auf diesen Zielsubstraten/Substraten  
35 natürlicherweise vorkommen, daraus gezüchtet wurden oder aus Sammlungen stammen oder

andere Organismenstämme (z.B. Hochleistungsstämme), die in ihrem Enzymspektrum passend sind, zugegeben werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung ist ferner, dass das erfindungsgemäße Verfahren aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann. Diese Verfahrensstufen können generell gleichzeitig  
 5 ablaufen, d. h. es wird mit gleichzeitig eingesetzten mehreren Zielsubstraten/Substraten gearbeitet, zusätzliche Induktoren und/oder Hemmstoffe können gleichzeitig oder während der Kulturdauer zugegeben werden. Es können aber auch zeitlich hintereinander Substrate eingesetzt werden, wobei nicht alle per se Zielsubstrate sein müssen. Dies wird durch die kontinuierliche Verfahrensführung und modulare Bauweise des neuartigen Bioreaktors ermöglicht, der durch seine erfindungsgemäße  
 10 Bauweise eine zusätzliche Substratzugabe, Zugabe von anderen Induktoren, Hemmstoffen, Zugabe von Mikroorganismenkulturen, Änderung des Selektionsdrucks etc. während der Kulturdauer erlaubt. Damit verbundenen ist die wichtige erfindungsgemäße Option, die zeitliche Abhängigkeit der quantitativen bzw. qualitativen Produktion der Enzymgemische bevorzugt auch als Stellgröße für die Regelung des laufenden Prozess selbst aber auch der nachgeschalteten Zielprozesse zu nutzen.

15

Bei Anzuchten mit mehreren Verfahrensstufen (z. B. 2-stufig) wird abhängig vom Zielprozess auf geeigneten Substrate durch Ausnutzung des natürlichen Bewuchses dieser Substrate und gegebenenfalls durch eine zusätzliche, unterstützende Inokulation mit Reinkulturen (auch Hochleistungsstämme und auch aus Sammlungen) sowie durch Einstellen selektiver Bedingungen durch Wahl der Wasseraktivität,  
 20 des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. in einer ersten Phase eine entsprechende Mischkultur erzeugt. Ziel dieser ersten Phase des Verfahrens ist es, einen für die zweite Phase geeigneten Pool an mikrobiellen Populationen zur Verfügung zu stellen. Die Mischkultur wird in der zweiten Stufe des Verfahrens durch Zugabe eines weiteren Substrates, welches auch in der Regel das Zielsubstrat ist, und durch Einstellen gegebenenfalls anderer (als in der ersten Stufe) selektiver Bedingungen durch eine geeignete Wahl der Wasseraktivität, des pH-Werts, des Redoxpotentials, der Temperatur, der Verfügbarkeit von Sauerstoff, der Verfügbarkeit von Induktoren usw. gerichtet in eine stabile und adaptierte Mischkultur überführt (fine-tuning), die nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes Spektrum an Enzymen und/oder Metaboliten erzeugt, das an die zur Induktion verwendeten Zielsubstrate optimal adaptiert ist.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich auf alle technologischen Prozesse anwendbar, bei denen biologische Substrate verändert oder umgesetzt werden und eine Behandlung dieser Substrate durch Enzyme entweder Gegenstand der Prozesse selbst ist, oder aber als Vor- oder Zusatzbehandlung genutzt werden kann. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren für Prozesse aus der Holzverarbeitenden Industrie, der Papier- und Zellstoffindustrie, der Textilindustrie, der Lederindustrie,  
 35 der tierverarbeitenden Industrie, der Waschmittelindustrie, der Futterindustrie, der

Lebensmittelindustrie, in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung und in der Reststoffverarbeitung und Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

Gleichfalls ist der erfindungsgemäße Bioreaktor gegenüber dem geschilderten Stand der Technik für sich genommen neu und erfinderisch. Zugleich ist der Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des dargestellten erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet.

Andere Reaktortypen zur Festphasen-Kultivierung von Mikroorganismen wie beispielsweise 'Bioreactor for fermenting solids' (PCT WO 01/19954), 'Bioreactor having at least two reaction chambers' (WO 02/100999 A2), 'Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen und Bioreaktor' (PCT/EP03/01663) sowie weitere bekannte Feststoffbioreaktoren (Bautypen sind etwa Schneckenreaktoren, Trommelreaktoren, Tummreaktoren, Rieselfilmreaktoren usw.) sind, gegebenenfalls modifiziert oder in Form einer Kaskade, grundsätzlich ebenfalls geeignet.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, dass der erfindungsgemäße, kontinuierliche Bioreaktor, gegebenenfalls als Kaskade eingesetzt wird, um die zeitliche Abhängigkeit der Produktion der Enzymgemische zu deren Optimierung im Hinblick auf den Abbau des Zielsubstrats bzw. der Zielsubstrate simultan und sequentiell hin zu nutzen, d. h. es wird möglich, einen oder mehrere dem Enzymbildungsprozess nachgeschaltete Prozesse simultan oder sequentiell mit entsprechend optimierten Enzymcocktails simultan oder sequentiell zu versorgen.

Der erfindungsgemäße Bioreaktor (nach Abb. 1) besteht aus einer beliebigen Anzahl von Modulen, wobei insgesamt 4 Typen von Modulen vorgesehen sind. Alle Module bestehen aus einer Edelstahlröhre o. Kunststoffröhre (1), in der eine Schnecke mit Hohlwelle (2) drehbar gelagert ist. Die Schnecke ist mit Schikanen (3) zur vertikalen Vermischung des Fermentationsguts ausgestattet. Die einzelnen Module und auch die Förderschnecke können über ein geeignetes Verbindungssystem aneinander befestigt werden. Im zusammengesetzten Zustand werden die einzelnen Schneckenelemente gemeinsam von einem Motor (4) bewegt.

Das Fermentationsmodul (5) besitzt Düsenöffnungen (6) auf der Hohlwelle der Schnecke über die das Fermentationsgut belüftet werden kann. Weitere Belüftungsdüsen (7) befinden sich in der unteren Hälfte der Röhrenwandung verteilt. In der oberen Hälfte der Röhrenwandung sind Sprühdüsen (8) für die Zugabe flüssiger Medien angeordnet. Das sogenannte Induktionsmodul (9), welches im erfindungsgemäßen Verfahren zur Zugabe der erfindungsgemäßen Stoffe genutzt werden kann, besitzt eine Öffnung (10) mit Verschluss (11) für die Zugabe fester Stoffe auf der Oberseite der Röhrenwandung. Das Antriebsmodul (12) besitzt keine Düsen. Hier ist ferner eine der beiden Stirnseiten (13) der Röhre verschlossen. Dort sind der Antriebsmotor und das Lager (14) für die Welle befestigt. Auf der Oberseite der Röhrenwandung ist ein Trichter (15) mit Verschluss (16) für die

Zugabe fester Stoffe und gegebenenfalls für Inokulat vorgesehen. Das Erntemodul (17) besitzt ebenfalls keine Düsen. Stattdessen ist dort auf der Unterseite der Röhrenwandung eine Öffnung (18) mit Verschluß (19) zur Entnahme des Fermentationsguts befestigt. Eine der beiden Stirnseiten (20) der Röhre ist verschlossen. Dort ist das Gegenlager (21) für die Hohlwelle befestigt. Das Lager besitzt einen  
 5 Anschluss zur Belüftung (22).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor wie folgt kontinuierlich durchgeführt:

Entweder das Zielsubstrat selbst oder in Mischungen mit anderen Substraten oder mehrere  
 10 Zielsubstrate als Gemisch oder entsprechend dem Zielsubstrat ausgewählten Substrate werden über den Trichter (15) in das Antriebsmodul (12) kontinuierlich eingebracht. Gegebenfalls wird mit den Substraten auch ein definiertes Inokolum bestehend aus einer oder mehreren mikrobiellen Reinkulturen zugegeben. Das Fermentationsgut wird vor Beginn des Prozesses hinsichtlich der Wasseraktivität, des pH-Werts und des Redoxpotentials eingestellt. Die  
 15 Fermentationsmasse wird über eine geeignete Anzahl an Fermentationsmodulen mit Hilfe der Schneckenelemente (2) in Richtung Erntemodul (17) transportiert. In den Fermentationsmodulen (5) werden über geeignete Sensoren die Wasseraktivität, Temperatur, gegebenenfalls der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration kontinuierlich gemessen. Die Einstellung dieser Parameter erfolgt durch Steuerung der Belüftungsrate und des Feuchtegehalts der über die Belüftungsdüsen  
 20 (6,7) eingeblasenen Luft sowie durch die Zugabe von Wasser oder Pufferlösungen über die Sprühdüsen (8). Über das entsprechend positionierte Induktionsmodul (9) können kontinuierlich weitere Substrate ( bzw. Zielsubstrate) zur weiteren induktiven Optimierung der entstandenen Mischkultur in den Reaktor eingebracht werden. In den dem Induktionsmodul nachgeschalteten Fermentationsmodulen werden gegebenenfalls andere Kulturbedingungen so eingestellt, dass gerichtet eine stabile und definierte mikrobielle Mischkultur entsteht, die nach einer gegebenen Kulturdauer ein defininiertes Enzym- und/oder Metabolitspektrum so erzeugt, dass dieses am Erntemodul (17) zur Entnahme vorliegt. Die Kulturdauer wird über die Drehgeschwindigkeit der Förderschnecke und die Anzahl an Fermentationsmodulen eingestellt. Ebenfalls kann der Bioreaktor durch eine geeignete Anzahl und Zusammenstellung der Module an die  
 30 Zielerfordernisse angepasst werden. Die Förderleistung richtet sich nach der Befüllungshöhe des Reaktors. Das am Erntemodul (17) entnommene Fermentationsgut kann entweder direkt oder nach einer entsprechenden Aufbereitung kontinuierlich dem Zielprozess zugeführt werden.

Im Falle einer Anordnung mehrerer erfindungsgemäßer Bioreaktoren in Form einer Kaskade ist  
 35 der Übergang von einem in den nächsten Reaktor wie folgt vorgesehen: Das Erntemodul des vorgeschalteten Teilreaktors wird mit dem Beschickungsmodul des nachgeschalteten Teilreaktors



derart verbunden, dass das Erntemodul bodenständig mit einer beweglichen Schikane zur Strömungsteilung der Fermentationsmasse ausgestattet wird und das Erntemodul des vorgeschalteten Teilreaktors zwei verschließbare Ausläufe besitzt. Einer der beiden Auslässe wird mit dem Zulauf des nachgeschalteten Teilreaktors verbunden und dient der Weiterführung eines Teils des Substratstroms innerhalb des Prozesses. Der zweite Auslauf dient der Entnahme des anderen Teils des Substratstroms zur weiteren Verwendung. Dabei wird die Schikane so positioniert, dass der Substratstrom geeignet portioniert wird. Besonders bevorzugt wird werden die Förderschnecken der Teilreaktoren durch einen gemeinsamen Antrieb bewegt.

10

### **Anwendungsbeispiel:**

### **Kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails zur Optimierung der Biogassynthese aus nachwachsenden Rohstoffen**

- 15 Die vorliegende Erfindung, bestehend aus dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des Verfahrens wird durch das folgende Anwendungsbeispiel näher beschrieben.

Nachwachsende Rohstoffe enthalten große Mengen schwer abbaubarer Biopolymere wie Lignocellulose, Cellulose, Hemicellulosen (Xylan), Pektin, Cutin etc.. Diese mengenmäßig bedeutsamen Biopolymere, die den Hauptbestandteil oder wichtigen Anteil von Rapsabfällen, Stroh oder Heu bilden und in der Landwirtschaft in großen Mengen anfallen, können bislang in Biogasanlagen nicht oder nur suboptimal genutzt werden. Zudem ist ihr Einsatz als Futtermittel zum Teil durch gesetzliche Verordnungen begrenzt. Die Verwertung beispielsweise von Raps-  
20 Reststoffen in Biogasanlagen würde es ermöglichen, auf stillgelegten Flächen in größerem Maßstab Raps zur Biodieselgewinnung anzubauen, ohne bestehende Abkommen zwischen der EU und den USA zu tangieren.

Die Umwandlung von beispielsweise Rapsschrot in Biogas gelang bislang nur mäßig, da anaerob lebende Bakterien nur bedingt in der Lage sind, deren Bestandteile als Kohlenstoffquelle effizient  
30 nutzen zu können. Ebenfalls besitzen andere nachwachsende Rohstoffe wie Stroh etc. noch schlechter verfügbare Kohlenstoffquellen (Faserstruktur) für die Biogasproduktion.

Dieser Nachteil soll nun künftig dadurch behoben werden, dass dem Prozess der Biogassynthese aus Raps-Reststoffen das erfindungsgemäße Verfahren - durchgeführt in dem erfindungsgemäßen  
35 Bioreaktor - vorgeschaltet wird. Dies ermöglicht es den Betreibern einer Biogasanlage, nach

Bedarf an die zur Biogasproduktion verwendeten Substrate optimal angepasste Enzymmischungen selbst preisgünstig herzustellen.

Verfahrensgemäß wird bei einer 2-Phasenzucht bevorzugt in der ersten Verfahrensstufe auf Pressrübenschnitzeln (diese stellen selbst Reststoffe aus der Verarbeitung eines landwirtschaftlichen Produkts dar und stehen ganzjährig zur Verfügung) unter geeigneten Kulturparametern selektiv eine Mischkultur bevorzugt bestehend aus solchen filamentösen Pilzen erzeugt, die hydrolytische Enzyme produzieren. In einer zweiten Verfahrensstufe wird durch Zugabe des Zielsubstrats, hier von Rapsschrot (das im nachgeschalteten Prozess gemeinsam mit beispielsweise Rindergülle methanisiert wird), selektiv und gezielt eine konditionierte Mischkultur erzeugt, die ein dem Zielsubstrat Rapsschrot angepaßtes Spektrum hydrolytischer Enzyme (Cellulasen, Xylanasen, Chitinasen, Pektinasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen) nach einer gegebenen Kulturdauer produziert. Das gesamte, enzymhaltige Fermentationsgut wird dem Biogasprozess kontinuierlich zugegeben. Die aktiven Enzyme schließen innerhalb der Methanisierungsstufe die pflanzlichen Polymere des Rapsschrots auf. Durch eine geeignete Dosage der Enzymmischung kann außerdem der Spiegel freier Zucker in der Methanisierungsstufe auf ein optimales Niveau eingestellt und gehalten werden. So kann die Produktion von Biogas auf der Basis von Rapsschrot erhöht und die Umsatzzeiten deutlich verkürzt werden.

Durch das neue Verfahren können außerdem viele andere, bislang ungenutzte Substrate wie Hen und Stroh einer Verwertung in Biogasanlagen zugeführt werden.

Die vorliegende Erfindung, bestehend aus dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem erfindungsgemäßen Bioreaktor zur kontinuierlichen Durchführung des Verfahrens ist nicht auf die beschriebene Anwendung beschränkt.

Die beschriebene Anwendung ist in folgendem Beispiel näher erläutert:

### **Beispiel 1 (Zweiphasenkultur zur Erzeugung von Hydrolasegemischen für einen nachfolgenden Biogasprozess)**

20 g nicht-autoklavierte Pressrübenschnitzel werden mit Pufferlösung auf einen Gesamtfeuchtegehalt von 50% und pH 6.0 gebracht und bei 30°C 11 Tage inkubiert (1. Phase). In diesem Ansatz entwickelt sich eine Mischkultur aus *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus tubingensis*. Verschiedene Glucanasen, Xylanasen, Proteasen, Pektinasen, Esterasen und Lipasen werden von dieser Mischkultur sekretiert. Diese Mischkultur wird mit 10 g Rapsschrot, dass ebenfalls mit Pufferlösung auf 40% Feuchte und pH 5.5 gebracht wird, induziert (2. Phase). Als

Kontrolle werden 10 g Pressrübenschnitzel unter sonst gleichen Bedingungen zugegeben. Nach 6 Tagen Inkubation bei 30°C zeigt sich eine Dominanz von *Eurotium amstelodami* und eine Zunahme der Xylanaseaktivität um den Faktor drei bei gleichbleibender Cellulaseaktivität im Vergleich zur Mischkultur (Phase 1) und zur Kontrolle. Die hydrolytische Gesamtaktivität, gemessen als

5 Fluoresceindiacetat-Hydrolyse, steigt unter den gleichen Bedingungen um den Faktor 10. Mit diesem Enzymcocktail konnte im Laborversuch die Methanproduktion auf der Basis von Rapsschrot und Rindergülle (im Verhältnis 1:1, Gesamtfeuchtegehalt 65%) um 12% gegenüber der Kontrolle (Enzymcocktail durch Erhitzen inaktiviert) gesteigert werden. Mit dem Enzymcocktail des durch Zugabe

10 von Pressrübenschnitzeln anstelle von Rapsschrot erhaltenen Ansatzes ergab sich immerhin noch eine Steigerung der Biogasausbeute um 4%.

## Patentansprüche

- 1) Neuartiges Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor, entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, dadurch gekennzeichnet, dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten allein oder in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder mit diesen allein zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welche in einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.
- 2) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Substrate oder Zielsubstrate alle möglichen Rohstoffe oder Abfälle natürlichen (mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder menschlichen) und nicht natürlichen, industriellen Ursprungs und deren Gemische eingesetzt werden.
- 3) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Mikroorganismen in Mischkultur eingesetzt werden.
- 4) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Gattungen *Penicillium spec.*, *Aspergillus spec.*, *Trichoderma spec.*, *Fusarium spec.*, *Eurotium spec.*, *Absidia spec.*, *Neurospora spec.*, *Mucor sp.*, *Chaetomium sp.*, *Rhizopus sp.*, etc. eingesetzt werden
- 5) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Ascomyceten, Deuteromyceten) der Arten *Penicillium chrysogenum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum* eingesetzt werden.

- 6) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Pilze (Weißfäulepilze, Braunfäulepilze) der Gattungen *Trametes spec.*, *Pleurotus spec.*, *Phanerochaete spec.*, *Nematoloma spec.* und *Agaricus spec.* etc. eingesetzt werden.
- 7) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen Bakterien (Actinomyceten) der Gattungen *Streptomyces spec.* etc. eingesetzt werden.
- 8) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kontinuierlich erzeugten Enzym-Substrat-Pilz-Gemische entweder als solche eingesetzt werden, oder eine Abtrennung des Substrat-Pilz-Gemisches zur Gewinnung von flüssigen Enzymcocktails erfolgt.
- 9) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren aus einer bis mehreren Verfahrensstufen bestehen kann.
- 10) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zur Produktion dieser Enzymgemische (hydrolytische Enzymcocktails) zur Supplementierung einer Biogasanlage eine 2-Phasen-Anzucht durchgeführt wird.
- 11) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1. entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, erfolgen.
- 12) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen

Schneckenreaktor nach Abb. 1 entweder einzeln oder in einer Kaskade angeordnet in der beschriebenen Weise erfolgen.

5 13) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1 in der beschriebenen Weise zur kontinuierlichen Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails zur Optimierung der in einem weiteren Prozess folgenden Biogassynthese aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.

10

14) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erfindungsgemäße, kontinuierliche Bioreaktor als Kaskade eingesetzt wird.

15 15) Erzeugung von Mischkulturen, bestehend aus Mikroorganismen zur Herstellung von Enzymgemischen und/oder Metabolitmischungen nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenanzuchten in einem modularen und kontinuierlichen Schneckenreaktor nach Abb. 1 in der beschriebenen Weise zur kontinuierliche Produktion spezifischer Hydrolase-Coctails und/oder Oxidoreduktase-Coctails

20 für Prozesse aus der Holzverarbeitenden Industrie, der Papier- und Zellstoffindustrie, der Textilindustrie, der Lederindustrie, der tierverarbeitenden Industrie, der Waschmittelindustrie, der Futterindustrie, der Lebensmittelindustrie, in der Abwasser-, Abluft- und Bodenreinigung und in der Reststoffverarbeitung und Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe eingesetzt werden.

## **Zusammenfassung**

Neuartiges Kultivierungsverfahren auf der Basis einer Festphasen-Anzuchttechnik mittels speziellem, ebenfalls erfindungsgemäßem Bioreaktor, einem neuartigen, modularen und kontinuierlichen

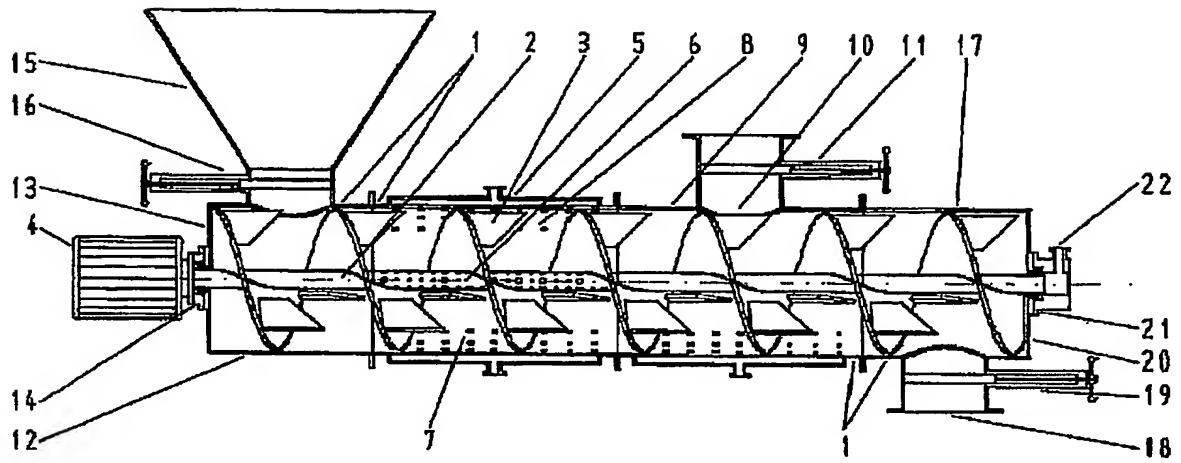
5 Schneckenreaktor, entweder einzeln oder in Kaskadenform angeordnet, dadurch gekennzeichnet dass eine adaptierte und stabile, mikrobielle Kultur, bevorzugt eine Mischkultur von Pilzen, in der Weise hergestellt wird, dass diese in dem erfindungsgemäßen Bioreaktor mit einem oder mehreren Zielsubstraten in allen möglichen Kombinationen mit anderen Substraten oder diesen allein allein

10 zusammengebracht wird und unter entsprechendem Selektionsdruck durch geeignete Wahl der Kultivierungsparameter wie Feuchtegehalt (Wasseraktivität), pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Redoxpotential und Nährstoffzusammensetzung etc. sowie durch

spezifische Induktion durch das oder die oben genannte(n) Zielsubstrate und/oder Hemmung mit speziellen Hemmstoffen nach einer gegebenen Kulturdauer ein definiertes, auf das oder die Zielsubstrat(e) hin optimiertes Enzymgemisch und/oder ein Metabolitgemisch produziert, welches in

15 einem nachfolgendem Prozess zum Abbau des oder der Zielsubstrate kontinuierlich eingesetzt wird.

Abb. 1





# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP2004/051234

International filing date: 24 June 2004 (24.06.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 103 28 552.0  
Filing date: 24 June 2003 (24.06.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 23 October 2004 (23.10.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse